昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2010, 53(2): 125 – 130 ISSN 0454-6296

稀有的黑檀体基因(*ebony*)5′UTR 自发突变导致黑腹果蝇的黑条体突变

金 珊, 曾庆韬*
(湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

摘要: 由于果蝇 *Drosophila* 群体中有很多自发突变其中包括多种体色突变, 因此它是一个研究自发突变的优秀的模式体系。本研究证实我们实验室发现的一个可以引起果蝇体色突变的自发突变(*bsr*)是一个黑檀体(*e*)的等位基因, 将其命名为 e^{bsr}。序列分析显示 e^{bsr} 的5′端缺失了953 个碱基, 其中包括外显子1 后端的206 个碱基及相连的内含子1 的747 个碱基。逆转录 PCR 结果显示 5′端的缺失导致内含子 1 不能从 mRNA 中剪接掉, 由此导致该 mRNA 的翻译起始密码子 AUG 前端增加了一个 3.2 kb 的序列。该序列导致 e^{bsr} 的 mRNA 的 5′UTR(5′-untranslated region)区较野生型基因增加近 3 kb 的长度。通过 mRNA 二级结构分析发现这个增加的 3 kb 的片段可以形成复杂的颈环结构(stem-loop)。免疫印迹结果显示该突变基因没有基因产物产生。本研究进一步证实了由于 mRNA 的 5′UTR 序列结构的改变可以影响到蛋白质的翻译。

关键词: 黑腹果蝇; 黑条体突变; 黑檀体; 缺失突变, 5′未翻译区
中图分类号: Q963 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2010)02-0125-06

A rare spontaneous 5′ UTR deletion in *ebony* results in black strip mutation in *Drosophila melanogaster*

JIN Shan, ZENG Qing-Tao* (College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: *Drosophila* is an excellent model to study spontaneous mutation due to the availability of a large collection of spontaneous mutants, such as body pigment mutants. Previously, we found a spontaneous pigmentation mutant, *bsr* (black strip), which was confirmed as an allele of *ebony* (*e*) and we named it as e^{bsr}. Subsequent sequencing of genomic DNA revealed a deletion of 953 nucleotides at the 5′ end of e^{bsr} including 206 nucleotides of exon 1 and flanking 747 nucleotides of intron 1. Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) showed that the deletion at the 5′ end of e^{bsr} leads to defective splicing, resulting in a transcriptional product with an additional 3.2 kb upstream of initiation codon AUG. RNA secondary structure analysis indicated that the unspliced 5′ UTR folds into complex structure containing several more stem-loops than that of wild-type *e*. Western blotting results indicated that translation of *e* was totally suppressed in e^{bsr}. This favors a model that the change of 5′ UTR structure of mRNA prevents the protein translation.

Key words: *Drosophila melanogaster*; black strip (*bsr*) mutant; *ebony* (*e*); deletion mutation; 5′-untranslated region (5′ UTR)

果蝇正常体色的形成要求 *tan*, *yellow*, *black* 及 *ebony* 等一系列基因的表达(Hodgetts and Konopka, 1973; Wright *et al.*, 1987; Wittkopp *et al.*, 2002; Richardt *et al.*, 2003)。*ebony* (*e*), *tan* 及 *yellow* (*y*) 基因编码的蛋白是形成黑色素的关键的限速酶(Wittkopp *et al.*, 2002, 2003)。其中任何一个发生突变均可导致果蝇体色的改变。至今为止在这些基因中已经发现了超过 1 000 种可以引起体色突变的等位基因, 其中包括 885 种黄体(*y*)等位基因(http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbidq.html?FBgn0004034&content =onepage), 214 种黑体(*b*)等位基因(http://www.flybase.org/.bin/fbidq.html?FBgn0000153)和 44 种黑檀体突变(*e*)等位基因(http://www.flybase.org/.bin/fbidq.html?content = allele-table& FBgn0000527)。其中绝大部分为诱导突变, 仅有 14 种黑体(*b*)突变、121 种黄体(*y*)突变和 14 种黑檀体(*e*)突变是自发突变。大部分突变均为染色体的倒转、插入及复制造成的,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870292, 30871368)
作者简介: 金珊, 女, 博士, 副教授, 主要从事动物遗传学研究, E-mail: jinshan20032003@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zengqit@hubu.edu.cn
收稿日期 Received: 2009-08-31; 接受日期 Accepted: 2010-01-19

极少有自发的缺失突变发生。目前已知的缺失突变仅有 b^{D}(Goldschmidt, 1944)、y^{bl}(Jolla, 1971)及 e^{4}(Pérez and Quesada-Allué, 2001) 3 种。

黑檀体突变由于其果蝇背甲带有黑色条纹而于1923 年被发现(Bridges and Morgan, 1923)。Caizzi 等(1987)把 *ebony* 定位于 3 号染色体的 93D1 区。随后该基因的结构、功能及表达模式得到了进一步的研究(Hovemann *et al.*, 1998; Wittkopp *et al.*, 2002)。目前已报道有 44 个经典 *ebony* 等位基因(http:// www. flybase. org/. bin/fbidq. html? content = allele-table&FBgn0000527),但其中仅有数种得到了进一步详细的研究。它们主要包括倒转突变: e^{1}(Walter *et al.*, 1996; Bridges and Morgan, 1923), e^{D12}(D'Alessandro *et al.*, 1977), e^{AFA}(Hovemann *et al.*, 1998; Caggese *et al.*, 1979), $e^{100.265}$(Ward and Alexander, 1957), $e^{100.307}$(Ward *et al.*, 1957), $e^{300.96}$(Ward *et al.*, 1957), e^{H3}(Henikoff, 1980)和 e^{N24}(Caizzi *et al.*, 1987);转座引起的突变: e^{D8}(D'Alessandro *et al.*, 1977), $e^{100.25}$(Lindsley and Zimm, 1994)和 e^{HI}(Henikoff, 1980);仅有一例缺失突变: e^{4}(Pérez and Quesada-Allué, 2001)。

1991 年,我们实验室从野生型群体中分离出了黑条体(*bsr*)突变果蝇(钱远槐和张菁, 1994; 钱远槐, 1995)。进一步的基因定位研究显示该突变是由于黑檀体基因突变造成的,因此我们把它命名为 e^{bsr}(张菁等, 2001)。通过本研究我们进一步揭示出该突变表型是由于 *e* 的缺失突变造成的。

1 材料和方法

1.1 果蝇家系

野生型黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 91910 采自于武汉。黑条体(*black strip*, *bsr*)是一个从 91910 群体中分离出来的自发突变体。e^{1} 作为黑檀体突变体对照来源于中国农业大学。

1.2 基因的克隆及序列测定

根据 GenBank 中 *ebony* 序列(GenBank accession no. AJ224446)设计引物。引物位置见图 1。引物序列如下: I_F(5′-GAGTTTCCCGAGTGCGTTGC-3′); I_R(5′-CCAAGAGAGCGTCAGTCCA-3′); II_F(5′-AGTAACGAC-AAGCAGGTGG-3′); II_R(5′-GATGACTCCTGGCGGTG-GT-3′); III_F(5′-GCCTCGAGGACAAGGTGGCTCTGAT-3′); III_R(5′-CCAAGCTTTTTGCCCACCTCCTTCCA-3′); VI_F(5′-AATCCTTGAATGCTTGACCGC-3′)。逆转录引物为 poly-dT。果蝇成虫 DNA 提取参见 Ashburner (1998) 储存于 -20℃。PCR 反应(50 μL): 50 ng DNA 模板, 20 pmol/L 引物, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 2 U *Taq* DNA 聚合酶,扩增条件为 95℃变性 3 min,随后 30 循环为 94℃ 60 s, 54℃到 62℃引物结合70 s, 72℃延伸 1 ~3 min,进一步延伸 72℃ 10 min。PCR 产物纯化(Sangon 纯化试剂盒,上海)连接入 pUC-18T 载体(TaKaRa Biological, 大连)。随后送公司测序。

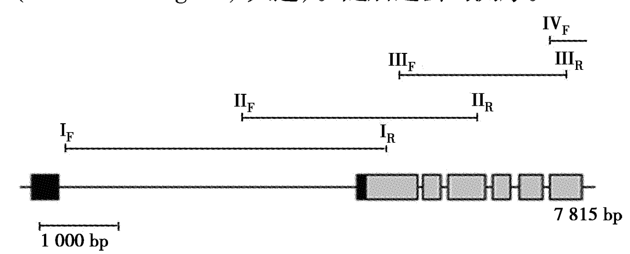


图 1 引物在 *ebony* 基因中的位置

Fig. 1 Position of primers in relation to the *ebony* sequence

ebony 长 7 815 bp; 灰色框代表外显子; 盒子之间的连线为内含子; TATA box 位于基因的 451 ~456 bp 的位置; mRNA 由 481 ~764, 4 619 ~5 742, 5 809 ~5 976, 6 064 ~6 835, 6 902 ~6 992, 7 054 ~7 229, 7 286 ~7 815组成; 5′UTR 及 3′UTR 用黑色框表示。5′UTR 由外显子 1 的 485 ~764 bp 及外显子 2 的 4 619 ~4 634 bp 组成。3′UTR 是 3′端的 208 bp。对于每对引物 N_F 代表上游引物, N_R 代表下游引物。ebony is 7 815 bp in length. Grey boxes represent exons. Lines between boxes represent introns. TATA box is located at 451 -456 bp. mRNA joins 481 -764, 4 619 -5 742, 5 809 -5 976, 6 064 -6 835, 6 902 -6 992, 7 054 -7 229 and 7 286 -7 815 bp. 5′UTR and 3′UTR are indicated with black boxes. 5′ UTR is composed of base pairs 485 -764 of exon 1 and 4 619 -4 634 of exon 2. 3′ UTR is 208 base pairs of 3′ end. For each pair of primers, N_F represents upstream primers and N_R downstream primers.

1.3 RT-PCR 及 3′RACE PCR

用 Trizol(Invitrogen, 上海)从 25 个龄期在 72 ~96 h 的蛹提取全果蝇 RT 反应(20 μL): 25 ng mRNA, 50 pmol/L oligo-dT, 2 μL AMV(TaKaRa Biotechnology, 大连),随后的反应同 Jin 等(2005)。扩增 *ebony* 的 5′端采用的引物为 I_F, I_R, II_F 和 I_R(图 1)。同时以 *Act5c* 作为对照组扩增 *actin*,其引物为 Act5c-1 (5′-GTGACGAAGAAGTTGCTGCTC-3′) 及 Act5c-2 (5′-ATCTGCTGGAAGGTGGACGAC-3′),产生的片段为 1 063 bp(Parsch *et al.*, 2001)。

3′ 端序列采用 3′ Race Kit (TaKaRa Biotechnology, 大连)扩增。其引物为 VI_F(图 1)。

1.4 RNA 二级结构预测

RNA 二级结构预测采用 http://www. bioinfo. rpi. edu/zukerm/cgi-bin/rna-index. cgi 的 MFOLD program(Zuker, 1994)。

1.5　抗体的获得及免疫印迹实验

$Ⅲ_F$ 及 $Ⅲ_R$(图1)用于扩增近于全长的 *ebony* cDNA(自N端第31个氨基酸开始)，将扩增片段连接入pGEX-T载体，随后在 *Escherichia coli* 中诱导表达重组蛋白，重组蛋白分离后注射兔子产生多克隆抗体。免疫印迹实验参照Wittkopp等(2002)方法。兔子针对于Ebony的一抗用0.3% TBS以1∶400稀释。二抗为羊抗兔IgG-HRP(亚法生物制品公司，武汉)。

2　结果与分析

2.1　黑条体突变体的 e^{bsr} 为一缺失突变

我们以前的工作结果显示黑条体突变是由于 *ebony* 基因的5′端缺失造成的，缺失的碱基从559～1 511的953个碱基，其中包括第一个外显子的206 bp及内含子1的747 bp(金珊等，2005)(图2)。为了进一步研究该缺失对基因表达产生的影响，我们通过RT-PCR扩增了突变体的 *ebony* 的cDNA。用引物 I_F 和 I_R 扩增基因组DNA时突变体 e^{bsr} 与野生型91910存在有明显差异(图3：A)。当用该对引物进行RT-PCR扩增时，结果显示在91910及 e^{bsr} 中均能扩增出逆转录产物，而 e^{1} 中没有产物扩增出来。然而，e^{bsr} 的RT-PCR产物的大小较91910的扩增的片段的要大，其长度更接近于 e^{bsr} 基因组PCR产物片段的大小(图3：A，B)。测序结果显示 e^{bsr} 的RT-PCR产物与基因组PCR产物是完全一致的。为了进一步排除RT-PCR产物来源于基因组DNA即提取RNA时基因组DNA造成的污染，我们选择了另一对引物 $Ⅱ_F$(位于内含子1中)及 $Ⅱ_R$(位于外显子4中)(图1)去扩增91910及 e^{bsr} 的基因组DNA及cDNA。结果显示在91910中的cDNA中没有扩增产物出现，而从 e^{bsr} 的cDNA扩增出的片段较 e^{bsr} 基因组扩增出的片段少了150 bp(图4)，测序结果显示在 e^{bsr} 中 *e* 的内含子2和3被剪切掉了，而内含子1没有被剪接掉。由此证明在 e^{bsr} 的转录后修饰加工中，内含子1没有从mRNA中剪切掉。通过3′RACE实验显示 e^{bsr} 的 *e* 基因3′端没有明显的改变。

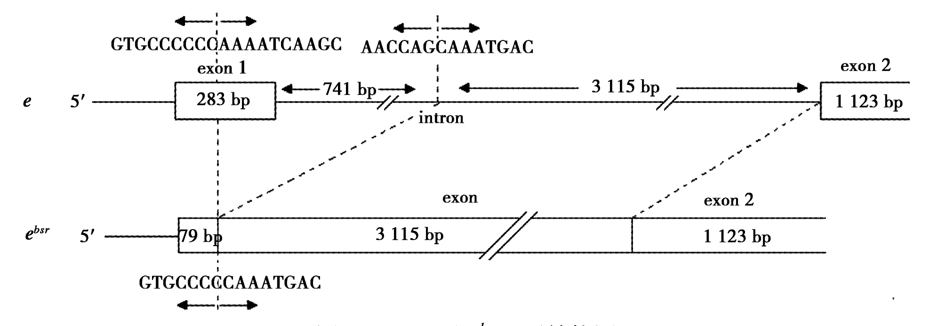


图2　*ebony* 及 e^{bsr} 基因结构图

Fig. 2　Gene structure of wild-type *e* (upper part) and mutant e^{bsr} (lower part)

白框显示的为外显子，连接白框之间的水平实线为内含子；在 e^{bsr} 中缺失导致内含子1的上游剪切位点丢失，由此产生外显子的漂移。Open boxes symbolize exons and solid horizontal lines between exons indicate introns. In e^{bsr}, a deletion results in the loss of 5′splice site of intron 1, leading to exon shuffling.

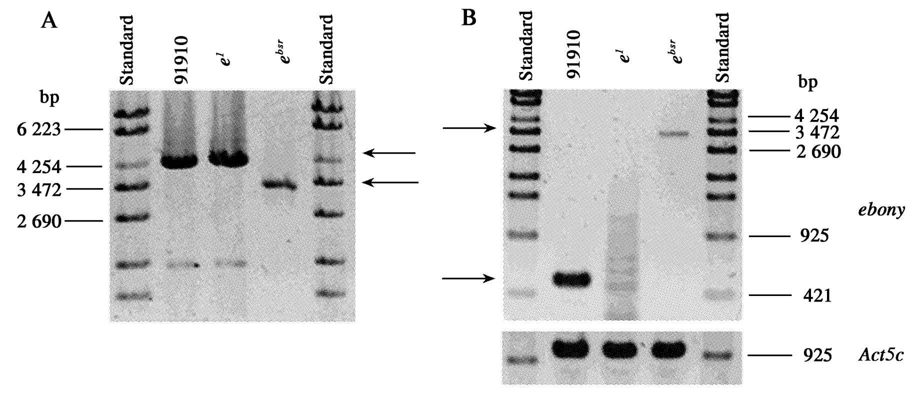


图3　引物 I_F 及 I_R 在野生型(91910)、e^{1} 及 e^{bsr} 基因组中PCR(A)和RT-PCR(B)扩增产物电泳图

Fig. 3　Genomic PCR (A) and RT-PCR (B) amplification products from wild-type (91910), e^{1} and e^{bsr} flies using primers of I_F and I_R

Act5c cDNA作为对照；A，B中扩增的条带均采用引物 I_F 和 I_R；箭头显示了引物 I_F 及 I_R 在基因组(A)及cDNA(B)中扩增产物。*Act5c* cDNA was amplified from each sample as a control. The fragments amplified with primers I_F and I_R from genomic DNA(A) and cDNA(B). The arrows indicate amplification fragments with primers I_F and I_R in both A and B.

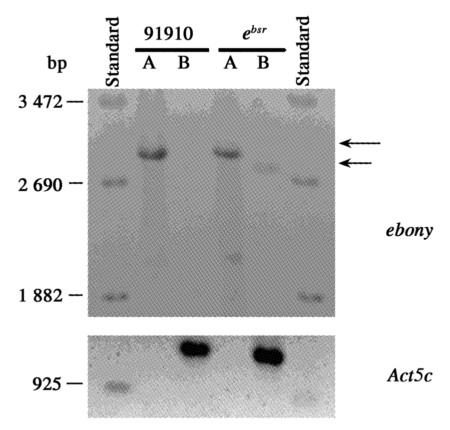


图4 引物 II_F 及 II_R 在野生型(91910)和 e^{bsr} 果蝇的基因组 DNA 与 cDNA 的扩增产物电泳图

Fig. 4 Amplification products of wild-type (91910) and e^{bsr} genomic DNA and cDNA with primers of II_F and II_R

A: 基因组扩增产物 PCR results of genomic amplification; B: RT-PCR 扩增产物 RT-PCR products. 大箭头显示基因组扩增产物，小箭头显示 RT-PCR 扩增产物; *Act5c* 为对照。The big arrow shows the genomic product, while the small arrow shows the RT-PCR product. *Act5c* cDNA was amplified as a control in the RT-PCR reaction (Parsch *et al*., 2001).

2.2 e^{bsr} 的 *e* 的 mRNA 的二级结构的预测

我们通过 MFOLD 程序预测野生型 *e* 及 e^{bsr} mRNA 的二级结构(Zuker *et al*., 1994)。由于 e^{bsr} 的 5′端的缺失造成了内含子 1 的上游剪切位点丢失，使得内含子 1 未缺失的部分(约 3 kb)在 mRNA 成熟剪接过程中没有被切除掉，因此，突变体 e^{bsr} 的 mRNA 较野生型的长约 3 kb。该 mRNA 的结构也更复杂，在其 AUG 上游形成多个结构复杂的颈环结构(图 5)。

2.3 在 e^{bsr} 中没有 ebony 蛋白质表达

我们通过在 *E. coli* 中表达 pET28A-ebony 融合蛋白，用于注射兔子产生多克隆抗体。免疫印迹结果显示该多抗可以识别约 97 kD 的 ebony 蛋白。免疫印迹结果显示 72 h 的野生型果蝇蛹可以看到 ebony 的表达，而 e^{1} 及 e^{bsr} 突变体没有看到该蛋白的表达(图 6)。

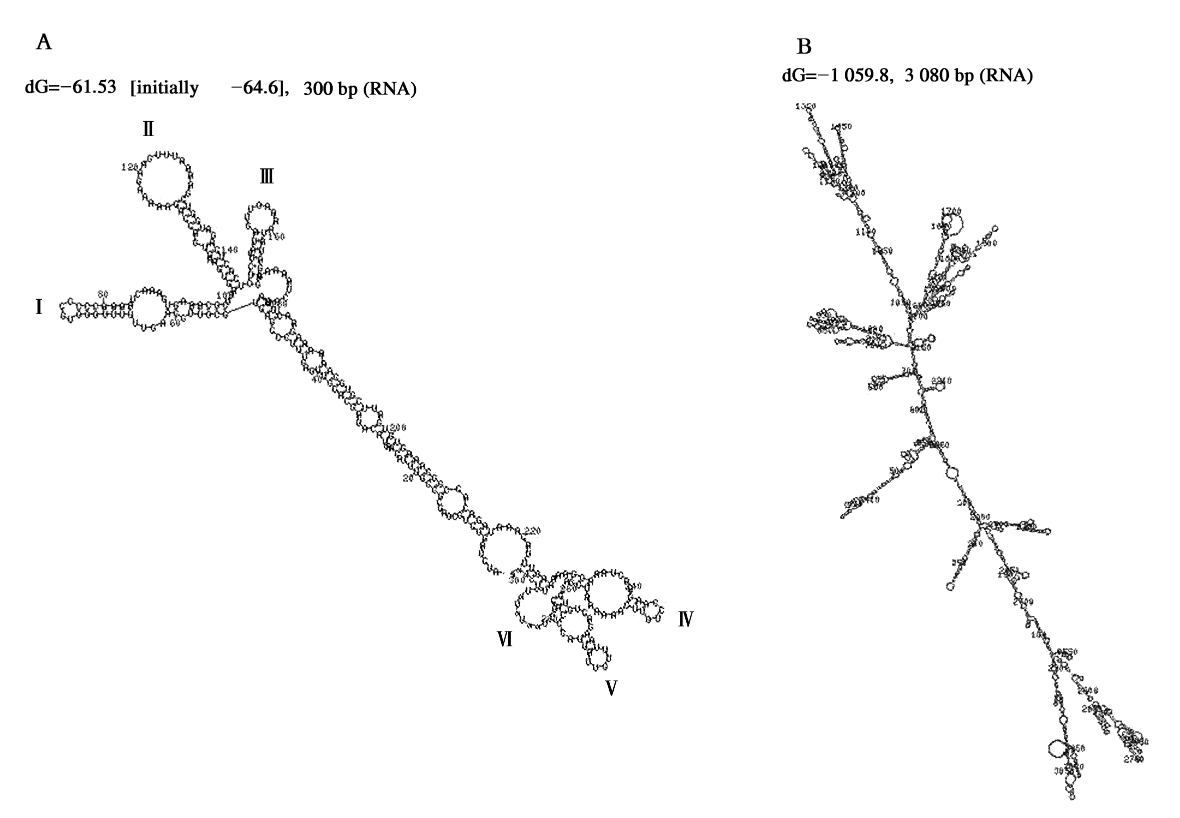


图5 由 MFOLD 预测的 5′UTR 的二级结构(24℃)

Fig. 5 MFOLD prediction of 5′ UTR secondary structure (at 24℃)

A: 野生型果蝇 *ebony* 基因 mRNA 起始密码子 AUG 上游的 300 bp (The 300 nucleotides upstream of AUG initiation codon of the wild-type *ebony* mRNA); B: e^{bsr} 的 mRNA 的 AUG 上游的 3 080 bp (The 3 080 nucleotides upstream of AUG initiation codon of e^{bsr} mRNA).

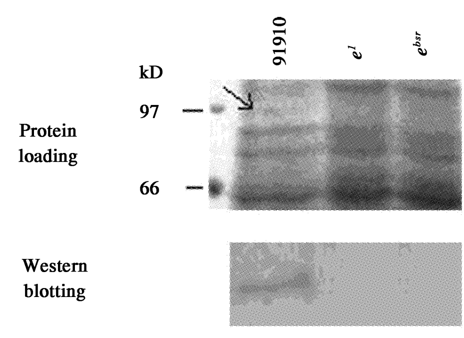


图 6　果蝇蛹蛋白质提取物的免疫印迹

Fig. 6　Western blotting of protein extracts from *Drosophila* pupa

下图为由兔产生的多克隆抗体可以有效地识别野生型果蝇的 97 kD 的 ebony 蛋白，而在 e^1 及 e^{bsr} 果蝇中没有该条带出现。上图为免疫印迹相应的样品的 SDS-PAGE 凝胶电泳(考马斯亮蓝染色)。箭头显示的野生型果蝇中约 97 kD 的蛋白。Antibody against ebony protein produced in rabbit recognizes a 97 kD protein in extracts from wild-type, but not from e^1 and e^{bsr} flies (bottom panel). The upper figure showing a SDS-PAGE stained with Commassie blue indicates protein loading. Arrow indicates a 97 kD band from wild-type.

3　讨论

ebony 在色素合成过程中由多巴胺(dopamine)到 β 氨基丙酸(β-alanine)代谢中起关键作用，而 β 氨基丙酸是合成黑色素的前体物(Wright *et al*., 1987)。ebony 蛋白可以使多巴转化为 N-β-丙酰多巴胺(N-β-alanyl dopamine, NBAD)。NBAD 可以用来产生黄色的体色。*e* 的突变可以导致与正常灰体色相对应的黑色体色，说明 *e* 产物可以抑制黑体色色素的形成(Bridges *et al*., 2003)。

在 e^{bsr} 果蝇中，e^{bsr} mRNA 序列显示由于内含子 1 的上游剪切位点的缺失导致内含子 1 不能从 mRNA 中剪切掉，因此产生了一个包括有内含子 1 的 6 000 bp 的 mRNA，相对于正常的 *ebony* 的转录产物 3 152 bp 的 mRNA 长了近一倍。在野生型果蝇的 *ebony* 中，其 5′UTR 序列为 300 bp，而在 e^{bsr} 的 mRNA 中其 AUG 的上游序列为 3 199 bp。这种异常长的 UTR 序列可以折叠成带有多个颈环的复杂结构(图 5)。

带有这种复杂 5′UTR 结构的 e^{bsr} 在表达时会出现什么样的结果呢？免疫印迹结果显示在果蝇 e^{bsr} 中没有 ebony 蛋白的表达。

在转录后调控中 5′UTR 起了重要的作用。在人的 hepatoma HepG2 γ-glutamyltransferase (GGT) 基因 mRNA 转录过程中，5′UTR 作为组织特异性调控的增强子而起作用(Diederich *et al*., 1994)。在 ODC 基因中，5′UTR 形成复杂而稳定的颈环抑制翻译的进行(Grens and Scheffler, 1994)。

一个正常的 mRNA 由 m^7G (7-methylguanosine) 帽子、5′UTR、开放阅读框(ORF)及 3′UTR 和 poly (A)尾部组成。所有这些成分均控制了 mRNA 的有效翻译。Kozak (1989; 1991)发现真核生物的核糖体不是直接结合于 mRNA 的 AUG 上，而是 40S 的核糖体结合于 5′端的甲基化的 cap 上，随后滑向 AUG。因此在 5′端通往 AUG 的过程中的一些顺势作用因子、核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)在转录起始中起了关键的作用。

在蛋白质翻译过程中，究竟哪个更重要一些，是 5′甲基化帽子还是 IRES？在脊髓灰质炎病毒中，其基因组 RNA 作为 mRNA 起作用。在转染细胞时可以允许核糖体直接进入 IRES 而有效地开始转录。通常 IRES 的二级结构包括 mRNA 5′端的 II, III, IV 及 V 颈环，它们可以直接结合核糖体(Paul *et al*., 1998)。而在 e^{bsr} 中缺失区域包括了其 5′UTR 的 206 bp，即颈环 II 到 V 的区域。同时在 e^{bsr} 的转录产物 mRNA 中，AUG 上游又增加了约 3 000 bp。各种不同种类的基因组结果显示通常情况下真核生物的 5′ UTR 序列一般介于 90 ~ 210 bp 之间(Pesole *et al*., 1997; Meijer and Thomas, 2002)。在果蝇中的热休克蛋白 70 (Hsp70)的 mRNA 中，延伸其长度 5′UTR 可以减弱热休克蛋白的表达；而相对较小的结构可以更有效地起始翻译(Hess and Duncan, 1996)。在野生型果蝇中，*ebony* 的 mRNA 的 5′UTR 序列由外显子 1 的 286 bp 及外显子 2 的 14 bp 组成；而在 e^{bsr} 的 mRAN 中，其 5′UTR 延伸到了 3 199 bp，到目前为止我们尚未知道有如此之大的 5′UTR 能够有效地起始翻译。假如 e^{bsr} 的 mRNA 从其他位点的 AUG 开始起始翻译蛋白，通常这种异常的蛋白都是无意义或极容易被蛋白酶降解的，因此，也不可能具有 ebony 的蛋白的功能。

致谢　ebony 的兔多克隆抗体制备于中国科学院武汉病毒研究所动物房。感谢湖北大学马力新教授在该课题完成过程中给予的支持。

参 考 文 献 (References)

Ashburner M, 1998. *Drosophila*: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, NY.

Bridges C, Morgan TH, 1923. The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Publ. Carnegie Inst*., 327: 50.

Caggese C, Caizzi R, Morea M, Scalenghe F, Ritossa F, 1979. Mutation generating a fragment of the major heat shock-inducible

polypeptide in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2 385 –2 389.

Caizzi R, Ritossa F, Ryseck RP, Richter S, Hovemann B, 1987. Characterization of the *ebony* locus in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, 206: 66 –70.

D'Alessandro A, Ritossa F, Scalenghe F, 1977. Cytological localization of the '*ebony*' locus in *Drosophila melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.*, 52: 46.

Diederich M, Wellman M, Siest G, 1994. Localization of a regulatory region on the 5′-untranslated region of human hepatoma HepG2 gamma-glutamyltransferase mRNA and response to dexamethasone and antisense oligonucleotide treatment. *FEBS*, 19: 307 –310.

Goldschmidt RB, 1944. New mutants report. *Drosoph. Inf. Serv.*, 18: 40 –44.

Grens A, Scheffler IE, 1990. The 5′- and 3′-untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA affect the translational efficiency. *J. Biol. Chem.*, 265: 11 610 –11 616.

Henikoff S, 1980. A more conventional view of the '*ebony*' gene. *Dros. Inf. Serv.*, 55: 61 –62.

Hess MA, Duncan RF, 1996. Sequence and structure determinants of *Drosophila* Hsp70 mRNA translation: 5′UTR secondary structure specifically inhibits heat shock protein mRNA translation. *Nucl. Acids Res.*, 24: 2 441 –2 449.

Hodgetts RB, Konopka RJ, 1973. Tyrosine and catecholamine metabolism in wild-type *Drosophila melanogaster* and a mutant, *ebony*. *J. Insect Physiol.*, 19: 1 211 –1 220.

Hovemann BT, Ryseck RP, Walldorf U, Störtkuhl KF, Dietzel ID, Dessen E, 1998. The *Drosophila ebony* gene is closely related to microbial peptide synthetases and shows specific cuticle and nervous system expression. *Gene*, 221: 1 –9.

Jin S, Zhang L, Zeng QT, Gui JF, 2005. Identification of mutational loci in black strip mutant of *Drosophila melanogaster*. *Zoological Research*, 26: 492 –498. [金珊, 张黎, 曾庆韬, 桂建芳, 2005. 黑腹果蝇黑条体突变位点的鉴定. 动物学研究, 26: 492 –498]

Jin S, Hu GA, Qian YH , Zhang L, Zhang J, Qiu G, Zeng QT, Gui JF, 2005. Identification of one intron loss and phylogenetic evolution of *Dfak* gene in the *Drosophila melanogaster* species group. *Genetica*, 125: 223 –230.

Jolla SL, 1971. The use of Y-autosome translocations in the construction of autosomal duplications and deficiencies. *Drosoph. Inf. Serv.*, 47 (Suppl.): 7.

Kozak M, 1989. The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.*, 108: 229 –241.

Kozak M, 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.*, 266: 19 867 –19 870.

Lindsley DL, Zimm GG, 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, CA. viii + 1 133 pp.

Meijer HA, Thomas AAM, 2002. Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5′-untranslated region of an mRNA. *Biochem. J.*, 367: 1 –11.

Parsch J, Meiklejohn CD, Hauschteck-Jungen E, Hunziker P, Hartl DL, 2001. Molecular evolution of the *ocnus* and *janus* genes in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 801 –811.

Paul AV, Boom JH, Filippov D, Wimmer E, 1998. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 21: 280 –284.

Pérez MM, Quesada-Allué, LA, 2001. The *ebony*^{4} mutant of *Drosophila melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.*, 84: 9 –12.

Pesole G, Liuni S, Grillo G, Saccone C, 1997. Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Gene*, 205: 95 –102.

Qian YH, 1995. The heredity analysis of character unsteadiness of black stripe (*bsr*). *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 17: 325 –328. [钱远槐, 1995. 黑腹果蝇黑条体性状不稳定的遗传分析. 湖北大学学报, 17: 325 –328]

Qian YH, Zhang J, 1994. The finding and elementary study of black stripe (*bsr*) mutant of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 15: 315 –328. [钱远槐, 张菁, 1994. 黑腹果蝇黑条体的发现与初步研究. 湖北大学学报, 15: 315 –328.]

Richardt A, Kemme T, Wagner S, Schwarzer D, Marahiel MA, Hovemann BT, 2003. Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for β-alamine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 278: 41 160 –41 166.

Walter MF, Zeineh LL, Black BC, McIvor WE. Wright TRF, Biessmann H, 1996. Catecholamine metabolism and *in vitro* induction of premature cuticle melanization in wild-type and pigmentation mutants of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 31: 219 –233.

Ward CL, Alexander ML, 1957. Cytological analysis of X-ray-induced mutations at eight specific loci in the third chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 42: 42 –54.

Wittkopp PJ, True JR, Carroll SB, 2002. Reciprocal functions of the *Drosophila* Yallow and ebony proteins in the development and evolution of pigment paterns. *Development*, 129: 1 849 –1 858.

Wittkopp PJ, Williams BL, Selegue JE, Carroll SB, 2003. *Drosophila* pigmentation evolution: Divergent genotypes underlying convergent phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 1 808 –1 813.

Wright TRF, 1987. The genetics of biogenic amine metabolism, scleiotization, and melamization in *Drosophila melanogaster*. In: Scandalios JG, Caspari EW eds. Advances in Genetics. Academic Press, San Diego. 127 –209.

Zhang J, Zeng QT, Xue XQ, Jin S, Yang Y, 2001. Studies of localization of black streak body gene in *Drosophila melanogaster*. *Acta Genetica Sinica*, 28: 527 –534. [张菁, 曾庆韬, 薛小桥, 金珊, 杨勇, 2001. 黑腹果蝇黑条体突变型的基因定位研究. 遗传学报, 28: 527 –534.

Zuker M, 1994. Prediction of RNA secondary structure by energy minimization. *Methods Mol. Biol.*, 25: 267 –294.

(责任编辑: 赵利辉)